

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

R4

(51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 38/18, 39/395	A1	(11) 国際公開番号 WO99/62554 (43) 国際公開日 1999年12月9日(09.12.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02818 (22) 国際出願日 1999年5月28日(28.05.99) (30) 優先権データ 特願平10/149530 1998年5月29日(29.05.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 矢富文博(YATOMI, Takehiro)[JP/JP] 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101-0032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR AUTOIMMUNE DEMYELINATING DISEASES (54) 発明の名称 自己免疫性脱髄性疾患予防・治療剤 (57) Abstract Preventives/remedies for autoimmune demyelinating diseases containing as the active ingredient an apoptosis inhibitor.		

アポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・

治療剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストラリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	ニカラガ	JP	日本	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KP	北朝鮮	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KR	韓国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ			PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

自己免疫性脱髄性疾患予防・治療剤

5 技術分野

本発明はアポトーシスを抑制する物質を有効成分として含有することを特徴とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤に関する。

背景技術

- 10 Fas は、ヒト線維芽細胞でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体である Fas 抗体 (Yonehara S. 等、J. Exp. Med., 169 巻、1747-1756 頁、1989 年) によって認識され、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞表面抗原である。Itoh N. 等によって、Fas 遺伝子がクローニングされ、Fas が約 45 kD の細胞膜上の蛋白質であり、そのアミノ酸配列から TNF レセプターファミリーに属することが
- 15 判明した (Cell, 66 巻、233-243 頁、1991 年)。また、マウス Fas 遺伝子もクローニングされ、Fas mRNA が、マウスの胸腺、肝、肺、心臓、卵巣で発現していることが確認された (Watanabe-Fukunaga 等、J. Immunol., 148 巻、1274-1279
- 20 頁、1992 年)。

ヒト Fas リガンドは、Fas を発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する生体内分子として、Nagata 等により報告されたポリペプチ

ドである (Takahashi T. 等、International Immunology、6巻、1567-1574頁、1994年)。ヒト Fas リガンドは、TNFファミリーに属する分子量約40 kDのII型糖んか蛋白質で、TNFと同様に、生体内で3量体を形成すると考えられている

5 (Tanaka M. 等、EMBO Journal、14巻、1129-1135頁、1995年)。また、ヒト Fas リガンドはラット Fas リガンド (Suda T. 等、Cell、75巻、1169-1178頁、1993年) やマウス Fas リガンド (Takahashi T. 等、Cell、76巻、969-976頁、1994年) と細胞外領域において高いホモロジーを有

10 しており、ヒト Fas リガンドはヒト Fas のみでなくマウス Fas をも認識し、アポトーシスを誘導することができる。逆に、ラット Fas リガンド及びマウス Fas リガンドも、ヒト Fas を認識してアポトーシスを誘導することができる。

また、Fas を介するアポトーシスの細胞内シグナル伝達機序に関しても

15 研究が進んでおり、Fas の細胞内領域、特にデスドメイン (Death domain) と呼ばれる領域と相互作用してシグナルを伝達または抑制する因子の同定及びクローニングが報告されている他、インターロイキン-1変換酵素 (ICE) 関連チオールプロテアーゼが Fas を介するアポトーシスのシグナル伝達に寄与している可能性が示唆されている。

20 近年、アポトーシス、特に Fas を介するアポトーシスと種々の疾患及び生理現象との関連が示唆されている。たとえば、ウイルス性劇症肝炎における肝細胞死及びある種の自己免疫疾患等において、Fas を介するアポトーシスの異常が

関与する可能性が示唆されている。

また、Fas/Fasリガンド系はアポトーシス以外の機能、たとえば、好中球に作用して起炎症性に働く作用等も担っている可能性が示唆されている (Kayagaki N. 等、臨床免疫 28巻、667-675頁、1996年)。

自己免疫疾患は、自己反応性リンパ球が自己抗原に反応し攻撃することにより起こる疾患であり様々な症状を呈する。正常時は生体は自己抗原に対して過剰な免疫反応を示さないため自己寛容が成立しているが、免疫調節機能に異常が生じると自己の成分に対して抗体を産生したり、自己反応性リンパ球が出現するようになる。この自己反応性T細胞は、本来、胸腺においてアポトーシスにより除去されるものであるが、何らかの異常により排除されることなく末梢に移行するとそこで蓄積されるようになる。また、B細胞においても自己寛容が成立しており、自己反応性B細胞もアポトーシスで除去されるが、何らかの異常により除去されることがない場合、T細胞と同様に末梢に蓄積されることとなる。このような自己反応性リンパ球が自己免疫疾患を引き起こす原因となる。

自己免疫性脱髄性疾患は、神経系に特異的な自己抗体により引き起こされ、髄鞘とその形成細胞が選択的に障害されて起こる疾患である。組織学的には髄鞘の消失、静脈周囲の細胞浸潤が認められる。臨床症状は失明、感覚障害、四肢の麻痺などの神経症状等が挙げられる。

脱髄性疾患は詳細な原因は解明されておらず、例えば寛解と再発を繰り返す多発性硬化症等の脱髄性炎症の発症原因は、自己免疫が関与する可能性 (De Keyser J.; Neurology, 38巻, 371~

374頁、1988年)の他に、ウイルス感染(Carp R. I. 等、Prog. Med. Virol., 24巻、158~177頁、1978年)が示唆されている。

- 従来の脱髄性疾患の治療は、免疫抑制剤とACTH(副腎皮質刺激ホルモン)
- 5 を併用する等の非特異的な免疫抑制による治療法(Saida K. 最新医学10巻、1963~1971頁 1991年)が挙げられるが、この治療法では長期的効果が認められず、さらに慢性進行型には効果が得られていない(Weiner等、Neurology 39巻、1143~1149頁、1989年)。このため、最近の治療では自己免疫T細胞の活動を特異的に
- 10 抑制する方法として、T細胞ワクチン(Ben-Nun A等、Nature、292巻、60~61頁、1981年)、T細胞レセプターワクチン(J. Immunol、152巻、2510頁、1994年、J. Immunol、152巻、2520頁、1994年)、経口免疫寛容(Science、259巻、1321頁、1993年)、ペプチドアナログ(Immunol.
- 15 Today、14巻、602~609頁、1993年)または抗CD4抗体等の投与が検討されている。しかし、これら治療剤の一部(T細胞レセプターワクチン)において自己抗原反応性T細胞の末梢血中の頻度を低下させる効果等が報告されているにすぎず、現状では著明な効果を示す結果は得られてはいない。

- 脊髄のホモジネートを結核死菌を含むフロイント完全アジュバントとともに皮
- 20 下接種すると感受性のある動物は10~14日後に後肢麻痺などの脳脊髄炎の症状を発症する。これが実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis、EAE)の原形

である。実験動物を脳由来の蛋白質抗原またはペプチドで感作することにより誘導される代表的な自己免疫病モデルであり、多発性硬化症および急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) の疾患モデルとして古くから精力的に研究されてきた。これまで、EAEの解析によって中枢神経系に発現するミエリン塩基性蛋白、プロテオ

- 5 リピッド蛋白などの自己抗原に特異的なT細胞が関与していることが (O t a K. 等、N a t u r e, 346巻、183~187頁, 1990年) 明らかになっている。

- 近年、多発性硬化症とF a s / F a s リガンド系を介したアポトーシスの関連についての研究が報告されている。S a m e e r D. 等は、ヒト多発性硬化症の
- 10 病変部位において、ミクログリア細胞と浸潤T細胞にF a s リガンドの発現を、オリゴデンドロサイトにF a s の発現を認めたと報告した (J. E x p. M e d., 184巻, 2361~2370頁, 1996年)。K i m b e r l y A. 等 (J. I m m u n o l., 158巻, 3096~3099頁, 1997年) 及びH a n s p e t e r W. 等 (J. I m m u n o l., 158巻,
- 15 3100~3103頁, 1997年) は、F a s またはF a s リガンドの遺伝的欠損マウスであるそれぞれl p r マウスまたはg l d マウスを用いた多発性硬化症の動物実験から、F a s / F a s リガンドを介したアポトーシスが多発性硬化症に関与することを示唆した。一方、E i l e e n A. 等 (J. C l i n. I n v e s t., 98巻, 1602~1612頁, 1996年) 及び
- 20 S u z a n a M. 等 (J. E x p. M e d., 186巻, 507~515頁, 1997年) は同じl p r マウスまたはg l d マウスを用いた多発性硬化症の動物実験から、F a s / F a s リガンドを介したアポトーシスが多発性硬化症に関

与しないことを示唆した。すなわち、多発性硬化症の病態と Fas / Fas リガ
ンド系を介したアポトーシスの関連については、研究者によって結果が異なり依
然不明のままであった。また、一般に脳組織は薬物の到達効率が悪く、生体に投
与された Fas / Fas リガンドによるアポトーシスを抑制する薬剤が、脳組織
5 内で Fas / Fas リガンドによるアポトーシスを抑制できるかどうかも未知で
あり、遺伝的に Fas あるいは Fas リガンドを欠損したマウスと同じ結果が得
られるかどうか不明であった。

現在までにアポトーシスを抑制することによる自己免疫性脱髄性疾患の予防・
治療剤はなく、また Fas リガンドに結合する治療剤も報告されていない。

10

発明の開示

本発明の課題は、アポトーシスを抑制するという新規な作用機序による自己免
疫性脱髄性疾患の予防・治療剤を提供することである。より詳しくは、本発明は
アポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治
15 療剤及び治療方法を提供する。

本発明者らは、自己免疫性脱髄性疾患患者を救うべく、アポトーシスと当該疾
患の関連性を鋭意研究してきたが、自己免疫性脱髄性疾患モデルにおいてア
ポトーシスを抑制する物質が病態を改善することを見出し、本発明を完成し
た。

20 すなわち、本発明は、下記の予防・治療剤に関するものである。

(1) アポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の
予防・治療剤。

(2) 前記アポトーシスを抑制する物質がF a s アンタゴニストである (1) に記載の予防・治療剤。

(3) 前記アポトーシスを抑制する物質がF a s - F a s リガンドの結合を抑制する物質である (1) または (2) に記載の予防・治療剤。

5 (4) 前記アポトーシスを抑制する物質がF a s 誘導体である (1) ~ (3) のいずれかに記載の予防・治療剤。

(5) 前記アポトーシスを抑制する物質が抗F a s リガンド抗体である (1) ~ (3) のいずれかに記載の予防・治療剤。

(6) 前記自己免疫性脱髄性疾患が中枢神経系に脱髄が起きている疾患である
10 (1) ~ (5) のいずれかに記載の予防・治療剤。

(7) 前記自己免疫性脱髄性疾患が急性散在性脳脊髄炎及び多発性硬化症からなる群から選ばれる少なくとも1つである (1) ~ (5) のいずれかに記載の予防・治療剤。

(8) アポトーシスを抑制する物質を投与する自己免疫性脱髄性疾患の予防・
15 治療方法。

(9) 自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療のための医薬品を製造するためのアポトーシスを抑制する物質の使用。

図面の簡単な説明

20 図1は、F L I M 5 8 のラットE A Eモデルにおける病態の改善効果を示すグラフである。

図2は、F L I M 5 8 のラットE A Eモデルにおける体重減少の改善効果を示

すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下にさらに詳細に本発明を説明する。

- 5 本発明の予防・治療剤の対象となる自己免疫性脱髄性疾患には種々の疾患が含まれる。大別すると脱髄状態が中枢神経に起きている疾患または脱髄状態が末梢神経に起きている疾患に分類される。好ましくは、脱髄状態が中枢神経に起きている疾患が本発明の対象となる。

- 脱髄状態が中枢神経に起きている疾患には急性散在性脳脊髄炎または多発性硬化症等が含まれる。急性散在性脳脊髄炎には特発性急性散在性脳脊髄炎、ウィルス感染性急性散在性脳脊髄炎またはワクチン接種後の急性散在性脳脊髄炎等が含まれる。多発性硬化症には同心円性硬化症または視神経脊髄炎（Devic病）等が含まれる。これらの疾患、特に多発性硬化症は、寛解と再発を繰り返すが、寛解時には予防剤として、再発時には治療剤としてそのいずれの時期においても
- 10
- 15 本発明の対象となる。

脱髄状態が末梢神経に起きている疾患には慢性炎症性脱髄性多発性神経根炎または急性炎症性脱髄性多発性神経根炎等が含まれる。急性炎症性脱髄性多発性神経根炎にはGuillain-Barré症候群等が含まれる。

- これらの疾患において、アポトーシスを抑制する物質が各疾患で起こっている
- 20 アポトーシスを抑制し、疾患の治療効果をもたらす。また、これらの疾患の寛解時またはこれらの疾患の病態傾向を有する時に、アポトーシスを抑制する物質が各状況で起こっているまたは起こりつつあるアポトーシスを抑制し、疾患の予防

効果をもたらす。

本発明の予防・治療剤の予防には、疾患が初めて起こる事を防ぐ際の予防、及び疾患が寛解後に再燃する際の再発予防等が含まれる。

5 なお、治療対象としてはヒトが重要であるが、ヒト以外の哺乳類も含みうる。

本発明で使用されるアポトーシスを抑制する物質とは、アポトーシスを抑制または阻害するものであれば特に限定されない。

10 具体的にはF a s アンタゴニストまたはF a s - F a s リガンドの結合を抑制する物質がある。これらは、F a s によるシグナルの発生または伝達をいずれかの段階で遮断し、F a s / F a s リガンド系の機能または生物作用（特にアポトーシス）を抑制するものであれば特に限定されず、F a s リガンド若しくはF a s の作用、機能若しくは発現を抑制するもの、F a s リガンド細胞外領域若しくはF a s 細胞外領域と相互作用するもの、F a s リガンドとF a s の相互作用を抑制するもの、F a s 細胞内領域とそれと相互作用する細胞内因子との相互作用に影響するもの、またはF a s を介するアポトーシスのシグナル伝達に関する細胞内因子（例えばI C E 様プロテアーゼ）の活性を抑制するもの等のさまざまな作用機序を有するものが含まれる。また、タンパク質性の高分子物質または低分子の化合物のいずれもが含まれる。

20 より具体的には、F a s を介するアポトーシスを抑制する活性を有する、F a s 誘導体、抗F a s 抗体、抗F a s リガンド抗体、F a s 若しくはF a s リガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、F a s 若しくはF a s リガンドのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、F a s の

細胞内領域と相互作用する物質またはICE阻害剤が挙げられる。ここで、本発明で用いるアポトーシスを抑制する物質としては、Fasを介するアポトーシスを抑制する作用を有する、Fas誘導体、抗Fas抗体または抗Fasリガンド抗体が好ましい。さらに、抗Fas抗体または抗Fasリガンド抗体はその治療

5 対象由来のそれぞれFasまたはFasリガンドを抗原とする抗体が好ましい。

例えば、ヒトの治療にはヒト由来のFasまたはFasリガンドを抗原とする抗体すなわち抗ヒトFas抗体または抗ヒトFasリガンド抗体が好ましい。

また、抗Fasリガンド抗体はキメラ抗体またはヒト化抗体が好ましい。キメラ抗体は、例えばヒトの治療にはヒト抗体からの定常領域及び非ヒト抗体からの

10 可変領域からなるキメラ抗体が好ましい。ヒト化抗体は、例えばヒトの治療には定常領域及びフレームワーク領域（FR）がヒト由来で、相補性決定領域（CDR）が非ヒト由来であるのが好ましい。さらに好ましくは、再構成（reshaped）したヒト型抗体（ヒト抗体）を本発明に用いることができる。これはヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体の相補性決

15 定領域へ置換したものである。非ヒト抗体は、ヒトの治療に用いる際には比較的循環半減期が短い、重要な免疫グロブリンの機能的特性を欠くまたは免疫原性を有する等の生物学的短所が生じることがある。さらに今後種々のマウス若しくは他の生物のヒトに対する抗原性を有するモノクローナル抗体が開発されると、いずれかの異なった非ヒト抗体を用いた最初若しくは初期の数回の処置の後、それ

20 に続く関連のない療法のための処置でさえ、交叉反応性のために効果がなかったり、若しくはそれ自身が危険な物質となることがあり得る。キメラ抗体またはヒト化抗体はこれらを克服する。

また、本発明で用いる Fas アンタゴニストは、WO 95/13293 号公報などに記載されている適当なアッセイ法において Fas 発現細胞のアポトーシスを抑制するものが好ましい。本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

- 5 なお、本発明で用いられる抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、また、本発明に使用される抗体の分子種は特に限定されない。抗原に結合し Fas を介するアポトーシスを阻害するかぎり、通常の形態の抗体分子であってもよいし、抗体の断片も使用することができる。例えば、Fab, F(ab')₂, Fv または H鎖と L鎖の Fv を一本鎖となるような適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv (SCFv) も使用することができる。これらのうちでも特に平成 7 年 6 月 22 日付で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号 P-15002）、さらに平成 8 年 5 月 9 日付で原寄託から国際寄託に移管した（受託番号 FERM BP-5535）ハイブリドーマ F919-9-18 に
- 10 より産生されるマウス F919-9-18 抗体が好ましい例である。

本発明で用いる抗 Fas リガンド抗体または抗 Fas 抗体は、公知技術を利用して作製することが出来る。例えば国際特許出願公開 WO 95/13293 号公報及び WO 95/02290 号公報等に作成方法が記載されている。本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

- 20 本発明で用いる事ができるキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法を用いて製造することができる。例えば国際特許出願公開 WO 95/13293 号公報の実施例 1 にキメラ蛋白質の作成方法が記載されている。本明細書はこの公報を

引用し、これをもって本明細書の一部とする。

本発明に用いるヒト化抗体は、Riechmann L. 等、Nature、
332巻、323頁、1988年、第0239400号ヨーロッパ特許公
報、Queen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻、
5 10029号、1989年、国際特許出願公開WO90/07861号公報、W
O92/11018号公報、Co等、Proc. Natl. Acad. Sci.
USA、88巻、2869頁、1991年、Co等、Nature、351巻、
501頁、1991年及びCo等、J. Immunol.、148巻、1149
頁、1992年等に開示されている方法を用いて製造することができる。本明細
10 書はこの文献を引用し、これをもって本明細書の一部とする。本発明の好適な例
としては、国際特許出願公開WO97/02290号公報の実施例に開示されて
いるマウス抗体F919-9-18抗体のCDRを有するヒト化抗Fasリガン
ド抗体が挙げられる。

本発明で使用されているFas誘導体は、少なくともFasリガンドとの結合
15 能を有するかまたはFasリガンドによるアポトーシスを抑制するものであ
れば、特に限定されない。公知のFasアミノ酸配列中に1以上のアミノ酸が欠
失、置換または付加といった任意の変異を有し、Fasリガンドとの結合活性を
維持したまま、Fas/Fasリガンド系の生物作用、特にFasを介するアポ
トーシスを抑制するものが含まれる。具体的には、Fas変異体、切断型
20 (truncated form) Fas、キメラタンパク質、融合タンパク質
または化学的に修飾されたもの等が含まれる。なお、その由来となるFasは上
記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来

のものを使用するのが好ましい。

より具体的には、公知のF a s の細胞外領域若しくは膜貫通領域を欠失したF a s、またはF a s 細胞外領域と他のタンパク質とのキメラタンパク質、例えばヒトF a s 細胞外領域とヒト免疫グロブリンのF c 領域のキメラタンパク質
5 であるヒトF a s - F c (h F a s - F c) 等が挙げられる。F a s 誘導体は、いずれの製法のものでも良く、公知の配列及び公知の遺伝子組換え技術等により製造することができる。例えば国際特許出願公開WO 9 5 / 1 3 2 9 3 号公報の実施例1 及びWO 9 7 / 4 2 3 1 9 号公報の実施例中等に作成方法が記載されている。本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

10 また、F a s のN末端に欠失を有するF a s 誘導体も好ましく、これらのうちでも特に平成8 年3 月1 4 日付けで日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号P - 1 5 5 1 4 及び受託番号P - 1 5 5 1 5）、さらに平成9 年3 月6 日付で原寄託から国際寄託に移管（受託番号F E R M B P - 5 8 5 4 及び受託番号F E R M B P - 5 8
15 5 5）されている大腸菌が含むプラスミド（p M 1 3 0 4 及びp M 1 3 1 7）にコードされているF a s 誘導体s h F a s (n d 2 9) - F c およびs h F a s (n d 2 9) - h i n g e（国際特許出願公開WO 9 7 / 4 2 3 1 9 号公報）は、公知のヒトF a s のN末端の1 番目から2 9 番目までのアミノ酸を欠失したF a s 細胞外領域を含有する誘導体であり、活性が高く、本発明の肝硬変の
20 予防・治療剤の有効成分として好適な例である。本明細書はこの文献を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

これらの本発明に用いるF a s 誘導体は、適当なアッセイ法によりF a s リガ

ンドに結合活性またはF a s を介するアポトーシスの抑制活性を有することがわかる。

本発明で使用されるF a s 若しくはF a s リガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはF a s 若しくはF a s リガンドのmRNAに対する
5 アンチセンスオリゴヌクレオチドは、F a s またはF a s リガンドの発現を抑制するものであれば、その配列は限定されない。その例として国際特許出願公開WO 95 / 1 3 2 9 3 号公報の実施例 2 0 に開示されているF a s リガンドのアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

- 10 本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、自己免疫性脱髄性疾患患者に対して治療剤として使用することが可能である。また、全身性自己免疫疾患若しくは神経系以外の臓器特異的自己免疫疾患有する患者、ウィルス感染者またはワクチン接種者等に対して自己免疫性脱髄性疾患に対する予防剤として使用することが可能であり、さらに自己免疫性脱髄性疾患、特に多発性硬化症等の寛解と
15 再発を繰り返す疾患に対して寛解時に再発予防剤として使用することが可能である。

本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、上述のアポトーシスを抑制する物質を含有することを特徴とし、少なくとも一種の医薬用担体または媒体、例えば滅菌水、生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸または
20 無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤または無痛化剤等を適宜組み合わせる医薬組成物やキットの形態を取る

ことができ、経口的に、または静脈内、冠動脈内、皮下、筋肉内、経皮、吸入、直腸内若しくは局所等の非経口的に投与することができる。

好ましくは非経口的に、全身または局部的に、急速または持続的に投与することができる。

- 5 ヒトに対する投与量は患者の病態、年齢または投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、全身投与の場合、約0.01～1,000mg/Kgの範囲で適当な分割容量を選択することが可能である。その範囲において約0.01～100mg/Kgの範囲で適当な分割容量を選択することが好ましい。しかしながら、本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療
- 10 剤の使用はこれらの投与方法または投与量に限定されるものではない。さらに、Fasアンタゴニスト、Fas-Fasリガンドの結合を抑制する物質若しくは抗Fasリガンド抗体等の複数のアポトーシスを制御する物質を組み合わせ使用しても、または他の薬剤と併用しても良い。

- 本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は常法に従って製剤化すること
- 15 ができる。例えば注射用製剤は、精製されたアポトーシスを抑制する物質例えばFasアンタゴニスト、Fas-Fasリガンドの結合を抑制する物質若しくは抗Fasリガンド抗体等を生理食塩水若しくは緩衝液等の溶剤に溶解し、必要に応じて吸着防止剤等を加えて製剤化する。また、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥させたり、凍結乾燥のための一般的な賦形剤を加えたりして製剤化して
- 20 も良い。

本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤に用いるアポトーシスを抑制する物質は、自己免疫性脱髄性疾患モデル、特に実施例で示す様な中枢神経系に脱

髄を起こす脱髄性疾患モデルにおいて、臓器及び組織の障害の抑制効果を示す。
実施例で示す臓器及び組織の障害の抑制効果は予防効果、治療効果及びそれらの
合いまった効果であるが、病態の再発モデルで検討することにより再発予防効果
を示すことができる。さらに、実施例では、マウスを用いたモデルで実験を行っ
5 ているため、抗マウスFasリガンド抗体を使用し臓器及び組織の障害の抑制効
果を示しているが、ヒトに用いる場合は抗ヒトFasリガンド抗体により実施例
と同様の効果が期待できる。

なお、本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、実施例において示す
とおり毒性がなく、安全に使用できる。すなわち、本発明の自己免疫性脱髄性疾
10 患の予防・治療剤は、自己免疫性脱髄性疾患に対して予防、治療または改善作用
が期待される。

以下に実施例をもって、本発明をいっそう具体的に説明するが、これらは実施
の一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではな
い。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いら
15 れる略号に基づくものである。

本発明の抗Fasリガンド抗体、ヒト化抗Fasリガンド抗体及びFas誘導
体の製法及びアポトーシス抑制活性は国際特許出願公開WO97/02290号
公報及びWO97/42319号公報の実施例に開示されている。

実施例1 抗マウスFasリガンド抗体の作製、生産及び精製

20 (1) 抗マウスFasリガンド抗体の作製

可溶型マウスFasリガンドWX2 (J. Immunology, 157巻、
3918-3924頁、1996年) 由来のマウスFasリガンド細胞外領域と

マウスCD40リガンドの細胞内領域、膜貫通領域および細胞外領域の一部（N末端から78アミノ酸）を融合したキメラ蛋白質をコードする遺伝子をヒトエロ
ンゲーションファクター（EF）プロモータの下流に有するプラスミドを作製し
た（Mizushima-Nagata, Nucleic Acids
5 Research, 18巻、5322頁、1990年）。上記プラスミドをWR
19L細胞にトランスフェクトし、細胞膜上にマウスFasリガンドを発現して
いる組換え細胞W40LFLを得て、投与抗原として用いた。免疫動物としてア
ルメニアハムスターを用いた。フロイント完全アジュバントと混合した $1 \times$
 10^7 個のW40LFLをアルメニアハムスターの皮下に投与し、1ヶ月後にP
10 BSに懸濁した 2×10^7 個のW40LFLを皮下に投与した。さらに1ヶ
月後、PBSに懸濁した 5×10^6 個のW40LFLをフットパッドに投与
した。3日後、リンパ節細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞P3-X63-
Ag8-U1（P3-U1）と細胞融合した。HAT培地（ヒポキサンチン-ア
ミノプテリン-チミジン）による選択の後、生育したハイブリドーマの中から、
15 その培養上清中にマウスFasリガンドによる細胞障害性を中和する活性を有す
るハイブリドーマFLIM58を得た。

(2) FLIM58の生産および精製

ハイブリドーマFLIM58を無血清培地Hybridoma-SFM（GIBCO BRL）にて培養し、その培養上清をプロテイン-Aカラム（PROS
20 EP-A, Bioprocessing）で精製し、精製抗体FLIM58を得
た。蛋白濃度は280nmの吸光度より算出した。

実施例2 抗マウスF a sリガンド抗体F L I M 5 8の毒性試験

(1) 方法

雄性、8週齢、DBA/1JマウスおよびC3H/Heマウス（日本チャールス・リバー製）を用いた。抗マウスF a sリガンド抗体F L I M 5 8を
5 100mg/30ml/kgの用量で尾静脈から投与した。またコントロール群
には生理食塩水を30ml/kgの用量で尾静脈から投与した。2種の系統とも
に各群3例とした。観察期間を7日間とし、体重測定、血液学的検査（赤血球、
白血球、血小板）、血液生化学的検査（GOT、GPT、尿素窒素）、肉眼によ
る剖検を行った。

10 (2) 結果

抗マウスF a sリガンド抗体F L I M 5 8投与群の投与後の体重増加、血液学
的検査値（赤血球、白血球、血小板）、血液生化学的検査値（GOT、GPT、
尿素窒素）はコントロール群と比べて差を認めなかった。また、肉眼による剖検
所見においても抗マウスF a sリガンド抗体F L I M 5 8投与群に異常は認めら
15 れなかった。

実施例3 抗マウスF a sリガンド抗体F L I M 5 8のラットEAEモデル（養
子免疫モデル，*adoptive transfer model*）
の病態改善効果

(1) ラット養子免疫モデルの作製

20 1mg/mlのH37Ra結核死菌を含有するフロイント完全アジュバン
ト（Difco Laboratories製）10mlを1000回転、
5分間遠心し、得られた沈殿を1.6mlのフロイント不完全アジュバン

(Difco Laboratories製)に再懸濁し、H37Ra結核死菌濃度を高めた完全アジュバントを作製した。モルモット脳由来ミエリン塩基性蛋白(Sigma製)を2.5mg/mlとなるように生理食塩水に溶解し、上述のH37Ra結核死菌濃度を高めた完全アジュバントと1:1に混合し、ルアー
5 ロック型ハミルトンガスタイトシリンジ(中央化学工業製)を用いてエマルジョンを作製した。

雌性、11週齢、Lewisラットを50mg/kgのペントバルビタール(大日本製薬製)を腹腔内に投与して麻酔した後、両後肢(Foot
pad)に上述のエマルジョン0.1mlをそれぞれ投与した。14日後、脾臓
10 を摘出し、ピンセットを用いてほぐした後、遠心し、得られた細胞沈殿を0.017Mトリス-0.747%塩化アンモニウム溶液中に懸濁し、赤血球のみ溶血させた。残った細胞をハネクス液(日水製薬製)で洗浄し、脾細胞とした。脾細胞を 4×10^6 個/mlの濃度で25 μ g/mlモルモット脳由来ミエリン塩基性蛋白、2mM L-グルタミン(日水製薬製)、10%非働化FBS
15 S(JRH Bioscience製)含有RPMI1640培地(GIBCO BRL製)に植え込み、5%炭酸ガス存在下37℃で3日間培養した。脾細胞培養液を1,000回転、5分間遠心した後、細胞沈殿をハネクス液に再懸濁した。この脾細胞を、雌性、11週齢、Lewisラットに 1.2×10^7 個/2ml/ラットの用量で腹腔内に移植してEAEモデルを作製し
20 た。

(2) 抗マウス Fas リガンド抗体 FLIM58 の投与

10mg/kgの抗マウス Fas リガンド抗体 FLIM58 を脾細胞移植の当

日 (day 0) および移植 6 日後 (day 6) に尾静脈から投与した。コントロール群には、正常ハムスター γ -グロブリン (ROCKLAND 製) からプロテイン A カラムを用いて精製した IgG を等量投与した。各群 5 例ずつとした。

5 (3) 評価

下記に示す表 1 のクライテリアを基に病態をスコア化 (Experimental Neurology, 151 巻, 221~228 頁, 1995 年) し、FLIM58 の投与効果を調べた。

表1 ラットEAEモデルの病態スコア

	スコア	病 態
5	スコア 0	正 常
	スコア 0.5	尾に不完全な麻痺がある (持ち上げた尾が正常ラットよりやややく落ちる)
10	スコア 1	尾に完全な麻痺がある (持ち上げた尾がパタンと落ちる)
	スコア 2	後脚の片方に麻痺がある
15	スコア 3	後脚の両方に麻痺がある
	スコア 4	瀕 死
20	スコア 5	死 亡

(4) 結果

結果を図1及び図2に示す。病態はday 5～day 6 (移植後日数5日～6

日後、以下同じ)に発生し、day 6以降においてFLIM58投与群の病態はコントロール群よりも軽度であった。また、病態発症に伴う体重減少はday 4～day 5から起こり、day 5以降においてFLIM58投与群の体重減少はコントロール群よりも軽度であった。

5 実施例4 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58のラットEAEモデル
(感作モデル、actively immunization model)の病態改善効果

(1) ラット感作モデルの作製

実施例3と同様にミエリン塩基性蛋白と完全アジュバントの1:1エマルジョンを作製し、麻酔下でラットの両足に0.1ml/foot padの用量を(0.2ml/ラット)投与した。

(2) 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58の投与

10mg/kgの抗マウスFasリガンド抗体FLIM58を脾細胞移植7日後(day 7)に尾静脈から投与した。コントロール群には、正常ハムスターγグロブリン由来精製IgGを等量投与した。各群5例ずつとした。

(3) 評価

実施例3に示した表のクライテリアを元に病態をスコア化し、FLIM58の投与効果を調べた。

(4) 結果

20 病態はday 10に発生した。FLIM58投与群の病態はコントロール群よりも軽度であった。

産業上の利用可能性

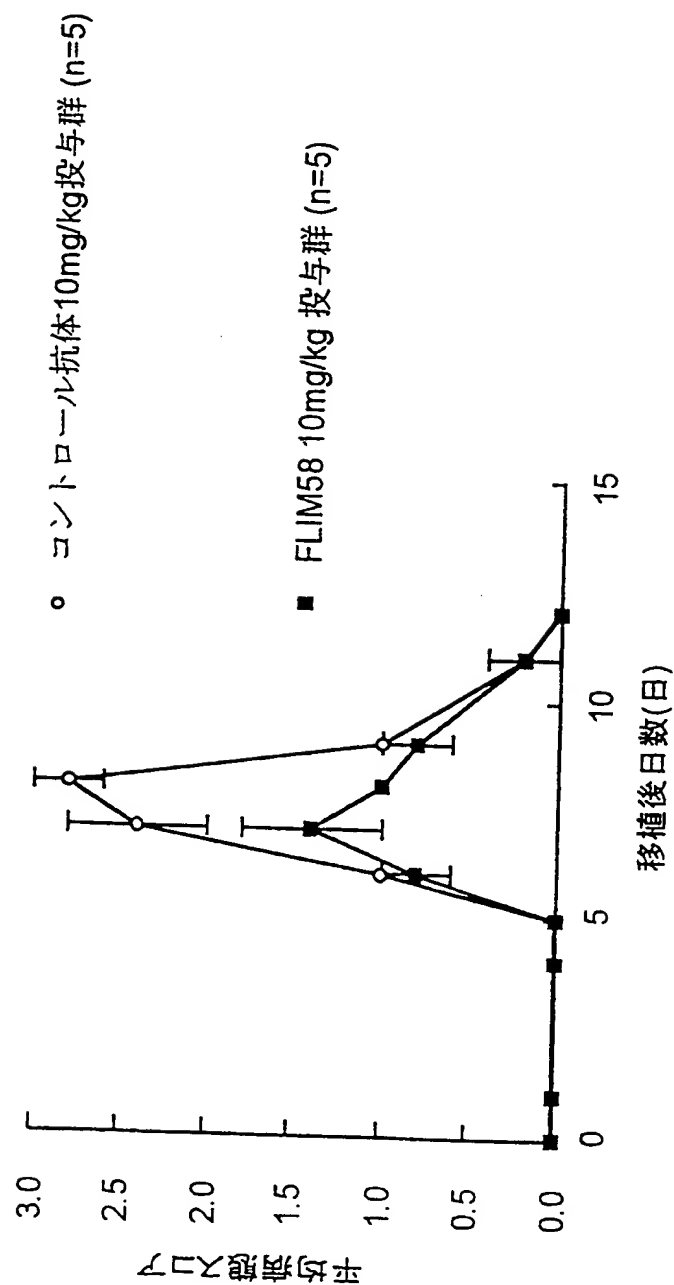
本発明のアポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、アポトーシスの抑制作用により、特にF a s を介した細胞の死に代表されるF a s / F a s リガンド系の生物作用等のアポトーシスが関与する自己免疫性脱髄性疾患の予防または治療効果を有する。従って、本発明のアポトーシスを抑制する物質は、F a s を介した細胞の死等、アポトーシスが関与する自己免疫性脱髄性疾患の疾患の予防・治療剤として期待される。

請求の範囲

1. アポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の
予防・治療剤。
- 5 2. 前記アポトーシスを抑制する物質がF a s アンタゴニストである請求項
1 に記載の予防・治療剤。
3. 前記アポトーシスを抑制する物質がF a s - F a s リガンドの結合を抑
制する物質である請求項1または2に記載の予防・治療剤。
4. 前記アポトーシスを抑制する物質がF a s 誘導体である請求項1～3の
10 いずれかに記載の予防・治療剤。
5. 前記アポトーシスを抑制する物質が抗F a s リガンド抗体である請求項
1～3のいずれかに記載の予防・治療剤。
6. 前記自己免疫性脱髄性疾患が中枢神経系に脱髄が起きている疾患である
ことを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の予防・治療剤。
- 15 7. 前記自己免疫性脱髄性疾患が急性散在性脳脊髄炎及び多発性硬化症から
なる群から選ばれる少なくとも1つであることを特徴とする請求項1～5のいず
れかに記載の予防・治療剤。
8. アポトーシスを抑制する物質を投与する自己免疫性脱髄性疾患の予防・
治療方法。
- 20 9. 自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療のための医薬品を製造するためのア
ポトーシスを抑制する物質の使用。

1/2

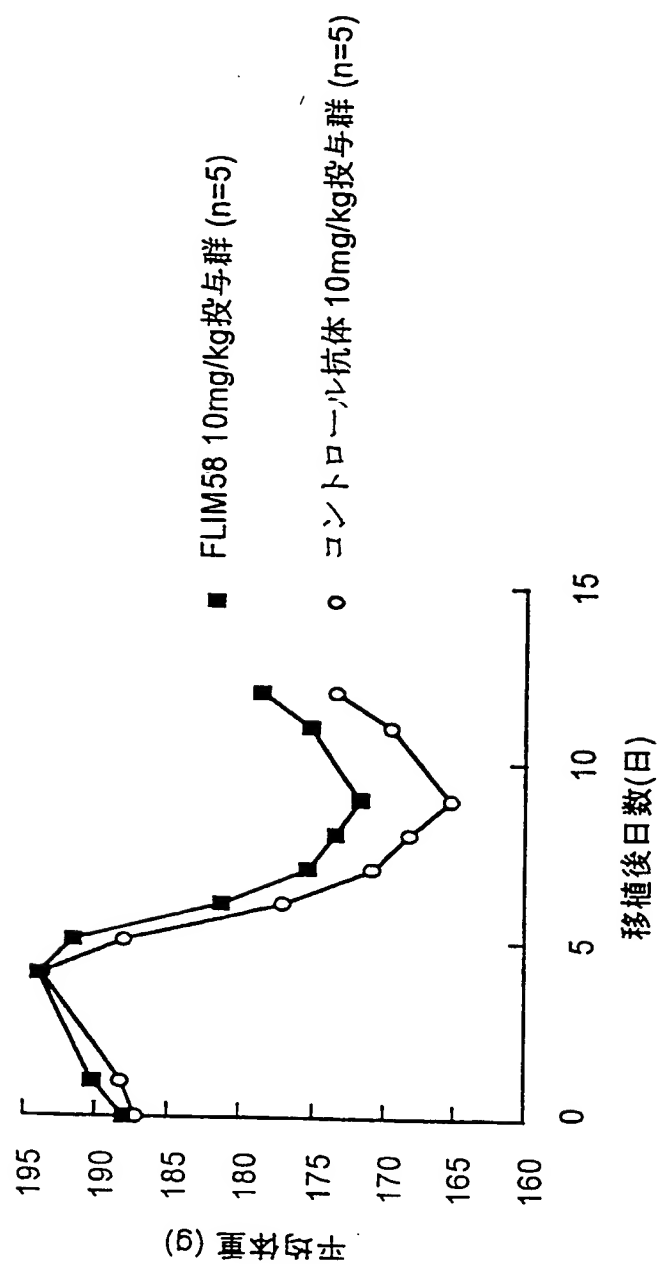
図 1

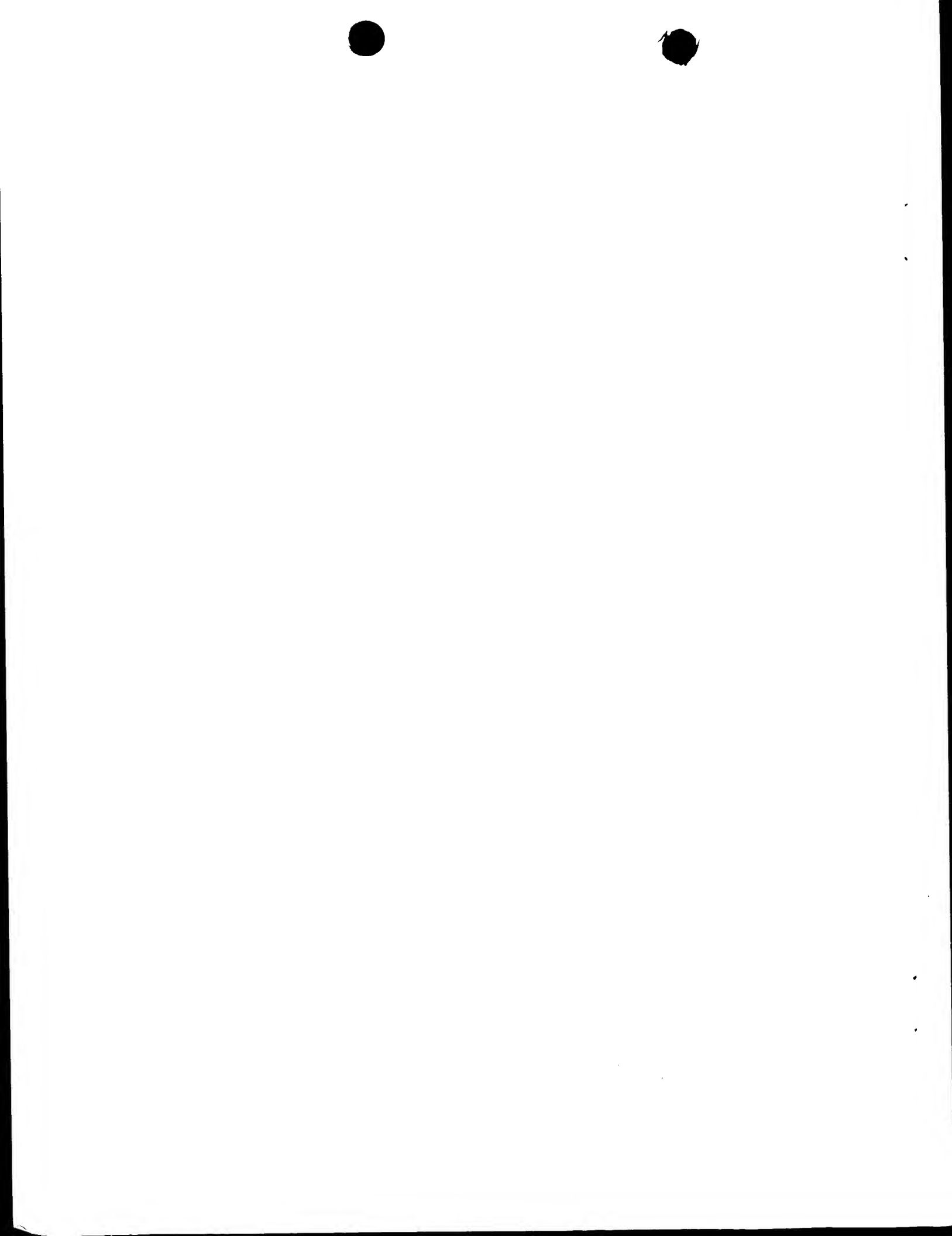




2/2

図 2





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/02818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61K45/00, 38/18, 39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A61K45/00, 38/18, 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 98/10070, A1 (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 12 March, 1998 (12. 03. 98), Claims ; page 254, line 15 to page 255, line 17 (Family: none)	1-7, 9
Y	JP, 63-230629, A (Microbial Chemistry Research Foundation), 27 September, 1988 (27. 09. 88), Reference as a whole & EP, 285883, A2	1-7, 9
Y	WO, 98/18487, A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 7 May, 1998 (07. 05. 98), Claims ; abstract ; page 16, line 7 to page 18, line 22 ; page 52 (Family: none)	1-7, 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
27 July, 1999 (27. 07. 99)

Date of mailing of the international search report
10 August, 1999 (10. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02818

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02818

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.[°] A61K45/00, 38/18, 39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.[°] A61K45/00, 38/18, 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/10070, A1 (住友電気工業株式会社) 12. 3月. 1998 (12. 03. 98) 請求の範囲、第254ページ 第15行-第255ページ第17行 ファミリーなし	1-7, 9
Y	J P, 63-230629, A (財団法人 微生物化学研究所) 27. 9月. 1988 (27. 09. 88) 文献全体 & E P, 285883, A2	1-7, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 07. 99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

沖原 下 浩一 印

4 C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/18487, A1 (持田製薬株式会社) 07. 5月. 1998 (07. 05. 98) 請求の範囲、要約、第16ページ第 7行-第18ページ第22行、第52ページ ファミリーなし	1-7, 9

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲8は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

